



TITLE:

Investigation of the essential amino acid residues of respiratory complex I in Escherichia coli for proton translocation(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Sato, Motoaki

CITATION:

Sato, Motoaki. Investigation of the essential amino acid residues of respiratory complex I in Escherichia coli for proton translocation. 京都大学, 2015, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2015-05-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.r12948>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	佐藤元亮
論文題目	Investigation of the essential amino acid residues of respiratory complex I in <i>Escherichia coli</i> for proton translocation（大腸菌呼吸鎖複合体Iのプロトン輸送における必須アミノ酸残基に関する研究）		
(論文内容の要旨)			
<p>ミトコンドリア内膜やバクテリアの細胞膜に存在するNADH-キノン酸化還元酵素（複合体I）は呼吸鎖電子伝達系で最大のタンパク質複合体であり、NADHからユビキノンへと電子を伝達する水溶性ドメインと、同反応に共役してH⁺を輸送する疎水性膜ドメインが接合した特徴的なL字型構造をとっている。複合体Iはその障害が種々の神経変性疾患の原因となることや、農業科学分野では殺虫・殺ダニ剤の作用点として有望であることから、本酵素の基礎研究の進展が期待されている。本論文では大腸菌の複合体Iを取り上げ、生物種間で保存されている種々の領域に約150種類の部位特異的変異を導入することで、キノン結合領域やH⁺輸送に必須のアミノ酸残基を同定した。これらの成果は以下のように要約される。</p>			
1. 水溶性ドメインに位置するサブユニットNuoIに含まれるFe-SクラスターN6aおよびN6bの近傍に位置するアミノ酸に変異を導入することで、僅かに酵素活性を維持する変異体（C63S、P71AおよびP110A）を見出した。これら変異体と野生型酵素のEPRスペクトルを比較した結果、両クラスターに特有のEPRシグナルを検出することに初めて成功した。これにより、従来、EPRスペクトル解析の妨害要因として考えられていた両クラスター間のスピンスピン相互作用は存在しないことを立証した。			
2. キノン結合領域の構造特性を明らかにするため、同領域を構成するサブユニットNuoDにアミノ酸変異を導入した。各変異体について、阻害剤に対する感受性変化を含めた諸性質を検討した結果、N末端近傍のループ構造がキノンおよび阻害剤の結合部位として重要な役割を担っており、Tyr273がユビキノンのキノン環部と相互作用している可能性が示された。一方、同相互作用が予想されていたHis224は、キノンとの結合に直接的に関与しないことが明らかになった。また、キノン結合領域背後のαヘリックス、ならびに同領域のサイトプラズム側上部に存在するサブユニットNuoBおよびNuoCとの接合点が、複合体I全体の構造維持に不可欠であることを示した。			
3. 膜ドメインのサブユニットNuoKには活性に重要な2つのグルタミン酸（Glu36およびGlu72）が、膜貫通型ヘリックスの中央部に存在する。両グルタミン酸の機能を解明するために、その位置を同一ヘリックス上でシフトさせた種々の変異型酵素（E36A/L32Eなど）を作成した。その結果、同一ヘリクスターン上にグルタミン酸をシフトした変異型酵素は活性を維持したことから、両グルタミン酸共に位置上の自由度が僅かにあることが明らかになった。これにより、両残基と隣接するサブユニットの極性アミノ酸との水素結合ネットワークが、H ⁺ 輸送において重要な役割を担っていることが示唆された。			

4. 膜ドメインのサブユニットNuoN、NuoMおよび NuoLは、互いに類似したNa⁺/H⁺アンチポーター様の構造からなる膜タンパク質である。NuoMとNuoLはH⁺ 輸送活性に関与していることがわかっていたが、NuoNサブユニットが同機能を担っている可能性は疑問視されてきた。そこで、NuoNに複数の変異を導入して解析した結果、膜貫通型ヘリックスの中央部に位置し高度に保存されている極性残基（Glu133、Lys217、Lys247、Lys395）が活性に必須であり、同サブユニットがH⁺ 輸送に関与していることを明らかにした。さらに、既にH⁺ 輸送を担うことが判明しているサブユニットNuoMおよびNuoLにおいて、NuoMのGlu407、並びにNuoLのArg175とLys342が活性に必須であることを新たに示した。これにより、膜ドメインに位置する必須残基は全て膜貫通ヘリックスの中央部に存在しており、特にサブユニットの境界に位置する極性残基の変異が酵素活性に大きな影響を及ぼすことが判明した。また、NuoN、NuoMおよび NuoLの7番目と12番目のヘリックスの歪曲点に存在しているPro残基は活性に必須ではないことを明らかにした。さらに、NuoNにおけるNuoLから伸びるヘリックスHLとの接合部分、およびNuoMのβシートとの接合点は、膜ドメインの構造を維持する上で重要であることがわかった。

以上の結果を総合することで、複合体IのH⁺輸送には各膜サブユニットの中央部を跨いだ水平方向の構造変化の伝播が重要であると推定した。さらに、H⁺ 輸送経路は多くの研究グループが着目している個々の膜サブユニットの内部だけではなく、膜サブユニットの境界領域にも存在している可能性を示した。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

ミトコンドリア複合体Iは、農薬科学研究や神経変性疾患研究における重要な酸化還元酵素であり、その基礎研究の大幅な進展が期待されている。しかし、非常に複雑な膜タンパク質複合体であるために、呼吸鎖酵素の中でも最も研究の進展が遅れている。近年の構造生物学研究の進展により、その全貌が徐々に明らかになりつつあるが、作動メカニズムの詳細は十分に理解されていないのが現状である。本論文は、ミトコンドリア複合体Iと相同性の高い14種類のサブユニットから構成される大腸菌複合体Iを取り上げ、部位特異的変異導入法により同酵素の機能を解析した一連の研究をまとめたものである。評価すべき点は以下の通りである。

1. 互いのスピン-スピン相互作用のためにEPR検出が困難だとこれまで考えられていたFe-SクラスターN6aおよびN6bのEPRシグナルをそれぞれ同定した。また、両クラスター共に水溶性ドメインの電子伝達に必要不可欠であることを示した。
2. NuoD サブユニットにおいて、Tyr273 がユビキノンのキノン環部と相互作用する必須のアミノ酸残基である可能性を示した。また、複合体 I 全体の構造を維持する上で必須な部位を明らかにするとともに、N 末端近傍のループ構造がキノンおよび阻害剤の結合領域を形成する上で極めて重要であることを見出した。
3. サブユニットNuoK、NuoN、NuoMおよびNuoLを解析することで、それらの膜貫通型ヘリックス中央部に存在する極性残基がH⁺輸送に必須であることを明らかにした。さらに、H⁺ 輸送経路が各膜サブユニットの境界領域にも存在している可能性を示し、膜ドメイン中央部における水平方向の構造変化の伝播がH⁺ 輸送に重要であることを示した。

以上のように本論文は、呼吸鎖複合体IのH⁺輸送における必須アミノ酸残基を明らかにすると共に、酸化還元反応を担う水溶性ドメインとH⁺輸送を担う膜ドメインの共役メカニズムに関する新たな知見を得たものであり、生化学、生体エネルギー学、構造生物学および生物有機化学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 27 年 3 月 6 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から 3 ヶ月以内）